

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR); Temel Prensipler (derleme)

Osman Selçuk ALDEMİR¹ Uçkun Sait UÇAN¹

Polymerase chain reaction (PCR); basic principles

SUMMARY

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a technique for the *in vitro* amplification of specific DNA sequences by the simultaneous primer extension of complementary strands of DNA.

PCR must be regarded as the most important advance in the life sciences to take place during the last decade. Its applications is being extended to wide variety of biological and medical disciplines. In this review, recent developments in methodology of the PCR are presented.

KEY WORDS: PCR (Polymerase chain reaction), principle

ÖZET

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), laboratuvar şartlarında spesifik bir DNA parçasının, primer bağlanımı ve uzanımı yolu ile DNA dan komplementer iplikçiğin oluşturulması esasına dayalı bir çoğaltma tekniğidir.

Moleküler biyolojide son 10 yılda kat edilen en önemli adım olarak kabul edilen PZR, uygulama alanı olarak gerek biyoloji ve gerekse hekimliğin bir çok alanında hızla yaygınlaşmaktadır.

Bu derleme ile PZR kullanımı konusundaki gelişmeler özellikle son araştırmalar dikkate alınarak özetlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu), prensip

GİRİŞ

Yeni bir yüzyıla girdiğimiz şu günlerde bilim dünyasındaki baş döndürücü gelişmeler insanlığın hizmetine yeni yeni teknolojik gelişmeler sunmaktadır.

Özellikle küreselleşmeden söz edilen günümüzde bir ülkenin bilimsel gelişmelere katkısının o ülkenin gelişmişliği ile doğrudan ilişkili olduğu pek çok kez belirtilmiştir.

Enfeksiyonların erken, kesin ve güvenilir teşhislerinde genetik düzeyde manipulasyonlara 30-35 yıl öncesinden başlanmış olmasına karşın, son 5-10 yıl içinde Batıda yapılan çalışmalar sayesinde pratiğe konan biyoteknolojik yöntemler oldukça yararlı bulunmuş ve konvansiyonel tekniklerin boşluklarını doldurulmaya ve giderilmeye başlandığı bildirilmiştir (Barker 1994, Arda 1995).

Moleküler tabanlı tanı yöntemi, klasik ve amplifikasyona dayalı yöntemler olarak iki ana başlıkta incelenmektedir (Barker 1994, Bilgehan 1992, Chamberlain ve ark. 1988, Coote 1990, Çağlayan 1991, Steffan ve Atlas 1991).

A. Klasik Yöntemler

Hibridizasyona dayalı nükleik asit prosedürleri son yıllarda medikal sahada teşhis metodu olarak geniş bir kullanım alanına sahip hale gelmiştir. Bunun başlıca nedenleri konvansiyonel metotlarla bakteriyel, viral ve paraziter etkenlerden ileri gelen bazı enfektif durumlarda kullanılan immunolojik ve bakteriyolojik testlerin önemli ölçüde yanlış negatif veya pozitif sonuçlar vermesi, özellikle immunolojik teknikler ile yapılan teşhislerde, antijenlere karşı oluşan çapraz reaksiyonlar ve aktif enfeksiyonla, geçirilmiş ya da latent enfeksiyonun ayrılmasındaki güçlükler ve standardize ayraçların gerekliliği gibi spesifik

dezavantajlara sahip olunmasıdır.

Klasik yöntemler arasında sıvı faz hibridizasyon, katı faz hibridizasyon ve *in situ* hibridizasyon yöntemleri yer alır (Dedyurin ve ark. 1962, Matthews ve ark. 1991).

Klasik yöntemler dışındaki yöntemler çoğaltma yöntemleri olarak adlandırılabilir. Bunlar;

B. Amplifikasyon (Çoğaltım) Teknikleri

a) Prop çoğaltım teknikleri

a.1. QB Replikaz yöntemi: QB replikaz enziminin 200 nükleotidlik bir zinciri, 1012 katına 13 dakikada ulaştırılma hızından yararlanılarak bu uygulanan bir yöntemdir.

a.2. Ligaz Zincir Reaksiyonu (LZR; LCR): Tek zincir DNA üzerine yanyana hibridize olan iki probun, DNA ligaz enzimi ile birbirine bağlanması ve çoğaltılması temeline dayanır.

b) Sinyal çoğaltım teknikleri: Nükleik asidin farklı bölgelerine bağlanan çok sayıda problemlerle işaretlerin sayısının artırılması şeklinde ifade edilmektedir.

c) Hedef nükleik asit çoğaltım teknikleri: Bu tekniklerin duyarlılığının çok yüksek olması sayesinde işaretli problemlerin kullanımına gerek kalmadan basit boyama yöntemleri ile sonuca gidilebilen ancak karmaşık olmaları nedeniyle standardizasyonunun güç olduğu metotlardır.

c.1. Self-Sustaining Sequence Replication (3SR): Transkripsiyona dayalı çoğaltım sisteminden yola çıkılarak geliştirilen bir yöntemdir.

c.2. Standart Displacement çoğaltım (SDA): İzotermal şartlarda yürütülen bu yöntemle, spesifik primerler, DNA polimeraz ve endonükleaz kullanılarak, bir nükleik asidin iki saatte yaklaşık 107 katına kadar çoğaltılabilen bir yöntemdir (Saiki 1985).

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

PZR, ilk defa 1983 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilen ve tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü olan bu çoğaltma işlemi ile bir DNA dizisinin çok kısa sürede (birkaç saat içerisinde) birkaç milyon defa çoğaltımına izin veren *in vitro* enzimatik bir metottur. İnsan ve hayvanların genetik hastalıklarının ortaya çıkarılmasından enfeksiyöz hastalıkların teşhisine, adli tıptan ekolojiye ve gıda kontrolüne kadar pek çok alanda kullanılmaktadır. Reaksiyonda, *in vitro* olarak DNA veya RNA da bilinen spesifik sekanslar, oligonükleotid primerler kullanılarak, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi yardımı ile çoğaltılmaktadır. PZR ile çift iplikçikli ya da tek iplikçikli DNA ve "ters transkripsiyon" işlemi vasıtasıyla DNA'ya dönüştürülen RNA'dan amplifiye edilebilir (Acuno ve ark. 1993, Allard ve ark. 1990, Arda 1995, Bej ve ark. 1990, Bej ve ark. 1991, Çağlayan 1991, Çetinkaya 1998, Day ve ark. 1990, Drenzo ve ark. 1996).

PZR'İN ÇALIŞMA PRENSİBİ

PZR bir çoğaltma yöntemi olması nedeniyle PZR öncesi ve PZR sonrası işlemlerden oluşur. PZR öncesinde, materyalin PZR için inhibitör olan maddelerden (protein gibi) arındırılması ve nükleik asidin ekstraksiyonu, PZR sonrasında ise çoğaltılmış nükleik asidin analizi gerekmektedir. PZR'nin temelini, hedef DNA'dan izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), kısa zincirli oligonükleotid primerleri ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz (Taq, Tth vs.) enzimi yardımı ile *in vitro* koşullarda çoğaltılması teşkil etmektedir. Çalışılan genetik materyal, çok az sayıda (tek bir mikrobiyel DNA sekansı) bulunsu bile veya diğer farklı DNA'lar arasında olsa bile, bu yöntemle, bunu 2-3 saat içinde milyon kere çoğaltmak ve sonra da çeşitli yöntemlerle tanımlamak olanaklıdır (Göral 1996, Guay ve ark. 1993, Muay 1990, Mulis ve Faloona 1987).

Bir PZR ortamında;

- 1- Aranan hedef DNA parçaları,
- 2- Oligonükleotid primerler
- 3- Termostabil (ısıya dayanıklı) DNA polimeraz (Taq polimeraz veya diğerleri)
- 4- Dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) bulunması gerekir (Erllich ve ark. 1992, Jackson ve ark. 1993).

DNA amplifikasyonunda, DNA polimeraz enzimi, kopya edilmesi amaçlanan hedef DNA sarmalının içerdiği bilgileri kullanarak, DNA molekülünün bir kopyasını üretir. Bu reaksiyon *primer* adı verilen ve hedef DNA'yı tamamlayıcı olan spesifik olarak bağlanan tek iplikli küçük sentetik oligonükleotitler tarafından başlatılır. Primerler spesifik bir dizi içerisindeki kısa nükleotid sıralarından meydana gelirler. Hedef bölgenin uçlarına bağlanarak DNA bölgesinin sınırlarını belirlerler. Sekanslar 5' ve 3' şeklinde iki uca sahip olup, çoğaltma sürekli olarak 5'ucundan 3' ucuna ve primerlerin yerleştiği bölgenin tersi yönünde gerçekleşir. Yeni şekillenmiş olan sarmal, orijinal hedef DNA'dan denatürasyon yoluyla ayrılır ve primer hibridizasyonu, DNA sentezi ve

denatürasyon siklusu tekrar edilir (Drenzo ve ark. 1992, Taylor 1993).

Bu ön hazırlıklardan sonra PZR, denatürasyon (ayırma), primerlerin bağlanması (hibridizasyon ya da annealing), polimerizasyon (sentez) olarak adlandırılan 3 aşamanın farklı ve kontrollü sıcaklık koşullarında tekrarlanmasından ibaret olup, bu üç basamak beraber tam siklusu oluştururlar. Bu işlem 25-30 defa tekrar edilerek üzerinde çalışılan hedef DNA'nın milyonlarcasının üretilmesi hedeflenir (Innis ve ark. 1988, Topkins 1992).

PZR öncesinde kullanılacak çeşitli marazi maddelerin inhibitörleri de içereceği söz konusu olacağından öncelikle, örnek DNA'nın saflaştırılması gereklidir. Ekstraksiyon yöntemlerinde örnek materyale, aranan nükleik asidin büyüklüğüne ve yapısına göre farklı uygulamalardan bahsedilmekte olup, her araştırmacı kendisine, kullandığı örneğe ve laboratuvar koşullarına uygun modifikasyonlarını belirlemektedir (Erllich ve ark. 1991, Hangen 1990, Lee ve Chang 1994).

Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bu iş için ayrılmış bir laboratuarda kontaminasyona karşı alınmış önlemler altında gerçekleştirilmelidir (Lawyer ve ark. 1989).

Günümüzde Fenol ekstraksiyon etanol presipitasyon metodu, Snounou metodu, Wataya metodu, Chelex metodu, Sodyum fosfat metodu ve Dondurma-Çözdürme metodu kullanılmakta olup, bu metodlar içinde en yaygın olarak Fenol ekstraksiyon etanol presipitasyon ve nispeten Dondurma-Çözdürme metodları kullanılmaktadır (Coote 1990, Lawyer ve ark. 1989).

Hedef DNA'nın Denatürasyonu

Bütün gerekli materyaller çok küçük miktarlarda mikrosantrifüj (Eppendorf) tüplerine konduktan sonra özel ısı bloğu (*Thermal cycler*) gözlerine yerleştirilir. Cihaz otomatik olarak sıcaklığı 90-95 °C'ye yükselterek bu ısıda hedef DNA'ların fiziksel denatürasyonu nükleik asidin iki iplikçisini bir arada tutan Hidrojen bağlarının kırılmasıyla birbirlerinden ayırmak suretiyle sağlar. Dönüşümlü bir reaksiyon olan denatürasyon için, materyalin türüne göre değişmek üzere ortalama 1-2 dakika gibi bir süre yeterli olmaktadır (Marx 1988, Saiki ve ark. 1985).

Hibridizasyon

Ayarlanmış olan süre sona erdikten sonra, ortamda bulunan iki tür primerin, her birinin komplementeri olduğu tek iplikçikli hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelere bağlanması için, programlanan ısı bloğu, sıcaklığı 37-65 °C'ye indirir. Bu bağlanma işlemi şu şekilde gerçekleşir; primerlerden biri kendine ait 5' ucu hedef DNA 'lardan birinin 3' ucu ile, diğer primer de, ikinci tek iplikçik DNA'nın antiparalel olan diğer ucunda bulunan 3' ucuna bağlanarak, DNA polimeraz'ın çalışma yönüne uygun olarak (5' → 3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması yaklaşık 0.5-1 dk. sürer. Bu basamak için gerekli olan ısı ve sürenin uzunluğu primerlerin nükleotid yapısına, primerlerin uzunluğuna ve PZR karışımındaki konsantrasyonlarına bağlıdır. Hibridizasyon ısısı genellikle primerlerin erime ısısının 5 °C altında olup 55-65 °C'lerde en iyi sonucu verir. Yüksek ısıların kullanılması yanlış nükleotidlerin

primerlerin 3' uçlarına bağlanmasını önler. Isı düşük tutulduğunda ise non-spesifik küçük DNA fragmentleri oluşur (Steffan ve Atlas 1991, Virella 1997).

Polimerizasyon

Bağlanma süresi bitince programlanan ısı bloğu sıcaklığı hemen 70-72 °C'ye çıkararak tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi veya diğer polimerazlar aracılığı ile, primerlerin 3' dizisine nükleotidlerin yerleşmesini sağlar. Böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Bu basamak 1-2 dak. sürmektedir. Sentez süresi hedef sekansın uzunluğuna ve konsantrasyonuna bağlıdır.

Bu safhalar, ısının tekrar 35 °C 'ye yükseltilmesi ile yenilenerek 25-30 kez tekrarlanması durumunda tek bir hedef DNA segmenti, 2ⁿ formülüne göre, yaklaşık 33.6 milyon defa çoğaltılmış olur. PZR amplifikasyon işleminin etkinliğinde 4 faktör önemli rol oynar. Birincisi PZR reaksiyonundaki döngü sayısıdır. Siklus sayısı arttıkça, enzimin tanınması gereken nükleotidlerin sayısının fazla olması neticesinde, geç PZR sikluslarının erken siklusa oranla daha az etkili olmasıdır. İkinci önemli faktör, çoğaltılacak hedef DNA miktarıdır. PZR reaksiyonu, yüksek konsantrasyonda hedef DNA (>10⁷) ihtiva eden numunelerle çalışıldığında, düşük konsantrasyondakilere (<10⁴) nazaran daha düşük düzeyde bir çoğaltımla neticelenir. Üçüncü faktör, hedef DNA sekansının uzunluğudur. PZR'in etkinliği ile sekans uzunluğu arasında ters orantılı bir ilişki mevcuttur. Dördüncü önemli faktör ise primer bağlanması ve hibridizasyon için kullanılan sıcaklık ile ilgilidir. Hibridizasyon ısı ile PZR'nin spesifitesi arasında pozitif bir ilişki mevcuttur. Yüksek ısıda PZR'de önemli bir problem olarak kendini gösteren yanlış hibridizasyonun oluşma ihtimali küçüktür (Penner ve ark. 1993, Perssing 1991, Reubel ve Studdert 1998).

PZR REAKSİYON KARIŞIMI

PZR'de kullanılan önemli bileşenler; hedef DNA, Taq DNA polimeraz, primerler, deoksinnükleotitler (Adenin, Timin, Guanin, Sitozin) ve Mg iyonlarıdır.

Hedef DNA Kaynakları

Genomik DNA içeren kan, gaita, lenf yumruları gibi her türlü doku ve organ, vücut sıvıları ve tek bir saç gibi pek çok materyal kullanılabilir. Hatta binlerce yıllık mumyalardan elde edilen DNA dahi PZR için kalıp olarak kullanılabilir.

PZR'in en büyük özelliklerinden biri, amplifiye edilecek hedef DNA'nın gerek kalitatif ve gerekse kantitatif olarak yüksek bir formda olmasına ihtiyaç duyulmamasıdır. Hedef örneklerin hazırlanmasında deterjanlar (Noritet, P40, Tween 20 ve/veya Trion X100, vs.) hücre membranlarının parçalanması için kullanılmakta olup, hücrel proteinlerin ayrıştırılmasında da proteinaz K kullanılmaktadır.

PZR'da Kullanılan Primerlerin Seçimi

Tekrarlanan dizilerden oluşmayan, sentetik olarak kolayca hazırlanabilen ve 15-40 oligonükleotidden oluşan primerler, kullanım amaçlarına göre değişiklik göstermektedirler. Buna göre; primerlerin üzerinde bulunan baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı, başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır. Primerlerin

yapısında %50-60 kadar G+C bazları bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur. Ayrıca böyle birleşmeler, yüksek ısıda oluşturulan çoğaltma sırasında görülebilecek non-spesifik bağlanmaları da azaltır (Saiki ve ark. 1988, Saiki ve ark. 1989, Triglia ve ark. 1988).

Primer konsantrasyonu ise 0,1-0,5 µM olarak tavsiye edilmiştir. Yüksek konsantrasyonları "primer dimer" adı verilen spesifik olmayan bantların oluşumuna yol açmaktadır. "Primer dimer"ler küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirleriyle bağlanması ya da DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotidleri kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşan bantlardır. Oldukça duyarlı olan PZR'da dikkat edilecek en önemli hususlardan bir diğeri de primerlerin sıra ve sayısıdır. Primerler seçilirken dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1- Primerlerin ortalama uzunluğu genel olarak prokaryotikler için 18-22 nükleotitten, ökaryotikler için ise 24-28 nükleotitten ibaret olmalıdır. Bazı spesifik teknikler için bu kurallar geçerli olmayabilir (31) (Örn: Random Amplifiye Polimorfik DNA= RAPD tekniği için primer uzunluğu 8-10 nükleotit olmalıdır).

2- Primerlerin spesifikliğı çeşitli şekillerde saptanmalıdır:

a- Uzun primerler spesifiteyi artırır.

b- Hibridizasyon sıcaklığı yükseltilerek spesifik olmayan hibridizasyonların önüne geçilebilir.

3- A-T ve G-C oranları yaklaşık %50 veya hedef DNA dakine benzer olmalıdır.

4- Primerler sürekli olarak 5' ucundan 3' ucuna doğru sentezlenmeli ve yazılmalıdır.

5- Primerlerin PZR reaksiyonundaki konsantrasyonları 0,1-0,5 µM arasında olmalıdır.

Primerler kullanılmadığında -20 °C'de sıvı kalan, amonyakda uygun olarak depolanabilir. Kullanmadan önce amonyaktan kurtarmak için bu stok solüsyonun 1-5 µl'si 95 °C'de 3 dak. ısıtılır. Primerlerin saklanma süresi, sıvı içerisinde en az 1 yıl, liyofilizasyondan sonra 24 aydır (Saiki ve ark. 1989).

Polimeraz Enzimleri

Escherichia coli DNA polimeraz I'nin Klenow fragmenti PZR'nin başlangıç çalışmalarında kullanılmıştır. Bu enzim ısıya duyarlı olup, yüksek ısılarda denatüre olur. Bu yüzden her PZR siklusu sonucunda taze enzimden yeniden ilave edilmesini gerektirir. Bu da para ve zaman kaybına neden olmaktadır. Bu problem sıcak su kaynaklarında yaşayan, termofilik bir bakteri olan, ısıya karşı çok dayanıklı *Thermus aquaticus*'tan DNA polimeraz enziminin elde edilmesiyle ortadan kalkmıştır. Taq polimeraz olarak adlandırılan bu enzim 95 °C'ye varan sıcaklıklarda yapısını korumaktadır. Enzim PZR döngülerinin tam bir serisinde baştan sona aktif kalabilir. Bu enzimin maksimum aktivitesi 72 °C'dir. Fakat denatürasyon ısısında zayıf bir etkinlik gösterdiği, 70-80 °C'de 30-65 baz/saniye olan ekstensiyon hızının 55 °C'nin altında ve 85 °C'nin üstünde önemli oranda düştüğü ve aktivitesinin yarılanma ömrünün 100 °C'de 5 dakikanın altında iken 95 °C'de 40 dakikaya çıktığı bildirilmiştir. Taq polimeraz, polimerizasyon sırasında ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca, bu enzimin kullanıldığı

sıcaklıklarda, oligonükleotid primerlerinin bağlanmaya meyilli oldukları yerlerden başka yerlere bağlanmaları önemli derecede azaldığından, PZR'ın seçiciliği ve duyarlılığı Taq polimeraz sayesinde artmıştır. DNA polimeraz için önerilen miktar 1.0-2,5 U/100 µl olup miktarı aştığı takdirde spesifik olmayan ürünler şekillenebileceği, enzim miktarı düşük olduğunda ise istenilen ürünün sentezin yetersiz olabileceği belirtilmektedir.

Son yıllarda farklı bakteri türlerinden izole, identifiye ve pürifiye edilen bir çok termostabil polimeraz enzimi denenmiştir. Bunlar arasında *Thermococcus litoralis*'ten izole edilen Vent Polimeraz, *Thermus thermophilus*'tan Tth polimeraz, *Pyrococcus furiosus*'tan pfu polimeraz ve *Thermotoga maritima*'dan da Tma polimeraz enzimleri sayılabilir. Vent polimeraz enziminin 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi yanlışlıkları düzeltme özelliği bulunmakta, ortamda fazla dNTP'lerin ve MgCl₂ iyonlarının bulunması durumunda, Taq polimerazdan daha iyi bir etkinlik göstermektedir. Bu enzimin yarı ömrü de daha uzundur. Tth polimerazda çok spesifik olup DNA'ya bağlı DNA polimeraz aktivitesi yanısıra, RNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi de (reverse transkriptaz) bulunmaktadır. Bu yönden Tth polimerazın Taq polimeraza üstünlüğü bulunmaktadır. Dfu polimeraz enzimi de termostabil olup, DNA sentezleme kapasitesinin Taq polimerazdan on iki kez daha fazla olduğu ve ayrıca hata yapma olasılığının ise daha düşük olduğu açıklanmıştır. Ancak, yüksek ısı yönünden etkinliği, Taq polimeraz'dan daha geride kalmaktadır (Erich ve ark. 1991, Innis ve ark. 1988, Lawyer ve ark. 1989).

Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTP' ler)

Nükleotitlerin PZR karışımındaki konsantrasyonları 20-200 µM olmalı ve 4 nükleotit de aynı oranda kullanılmalıdır. Hedef olmayan alanlarda yanlış primerleşmeyi azaltmak için hedef (target) sekansın uzunluğu ve bileşimi için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu kullanılmalıdır ve böylece yanlış bağlanmış nükleotidlerin uzama ihtimali azalır. Nükleotidlerin düşük konsantrasyonlarda kullanılması PZR'nın spesifitesini artırır. Nükleotitlerin optimal konsantrasyonlarını tespit etmek için amplifiye edilecek ürünün uzunluğu, MgCl₂ ve primer konsantrasyonları dikkate alınmalıdır. dNTP'ler -20 °C'de çalışma çözeltilerinin 100 katı yoğun konsantrasyonlarda saklanabilirler (Bilgehan 1992, Verhasselt 1992).

Diğer Reaksiyon Elemanları

PZR reaksiyon karışımında 0,5-2,5 mM MgCl₂ olması da gereklidir. Mg iyonları enzim aktivitesine, primer bağlanmasına, DNA erime ısısına etki eder. dNTP'lerin yüksek konsantrasyonları magnezyumu bağlar ve bundan dolayı mevcut magnezyum konsantrasyonu azalır. Eğer yüksek konsantrasyonda dNTP'ler kullanılıyorsa magnezyum konsantrasyonunun da artırılması gereklidir. PZR için önerilen tampon 10-50 mM Tris-HCl(pH 8.3-8.8) olup, tampona 50 mM kadar KCl'nin de ilave edilmesi primer bağlanmasını kolaylaştırması açısından söz konusu olabilir. Ancak fazla miktarda KCl'nin Taq polimeraz enzimini inhibe ettiği göz önüne alınmalıdır.

Tween 20 gibi iyonik olmayan deterjanlar jelatin ya da sığır serum albümini (100 g/ml) Taq polimerazın stabilizasyonu amacıyla kullanılabilir (Perssing 1991).

Eski model termal blokların dizaynından meydana gelebilecek buharlaşmanın önüne geçilmesi amacıyla, PZR karışımının üzerinin mineral yağ ile kaplanması unutulmamalıdır. Mineral yağın kullanılması aynı zamanda çapraz kontaminasyonun önlenmesinde de yardımcı olur. Yağlar reaksiyon sırasında ısı transferini engelleyeceğinden fazla miktarda kullanılmasından kaçınılması zorunludur. Bu amaçla 100 µl'lik reaksiyon karışımına 70 µl, 50 µl' lik karışıma ise 40 µl mineral yağ ilave yeterlidir (Perssing 1991, Steffan ve Atlas 1991). Yeni model termal bloklar reaksiyon tüplerini üstten ısıttığı için mineral yağ kullanımına olan gereksinimi büyük ölçüde kaldırmıştır.

PZR SONUÇLARININ GÖZLEMLENMESİ

PZR reaksiyonu sonucunda belirli uzunlukta bir veya birden fazla DNA parçacıkları elde edilir. PZR ile primerlerin sınırladığı çoğaltılmış ürünlerin sekans uzunluğu bilindiğinden, çoğaltılmış ürünün uzunluklarına göre ayrıştırılması amacı ile en yaygın olarak kullanılan metot, bu ürünleri uygun molekül ağırlıktaki bir marker (bilinen kontrol bantlar) ile birlikte Ethidium bromide ile boyalı agaroz jel üzerine yükleyerek, elektrik akımı uygulandığında negatif yüklü DNA'nın nötral pH'da anoda doğru hareketi esasına dayalı elektroforez işlemine tabi tutmak ve sonuçta ayrılan bantları UV transiluminatör ile gözle görülür bir hale getirilmesidir. (Boya UV ışığı ile floresans verir ve Jeller elektroforezisten sonra da boyanabilir). Bunun yanı sıra bu teknikten daha duyarlı fakat hazırlanması ve kontrolü daha zor olan Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) metodu da kullanılabilir. PAGE işleminden sonra oluşan bantlar bazı tekniklerle (örn: AgNO₃ ile boyama yöntemi) boyanarak gözle görülebilir hale getirilirler. Her iki teknikte de (agoroz jel elektroforezis ve PAGE) ürünler moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar. PAGE, özellikle küçük DNA fragmentlerinin (5-500 bp uzunluğunda) ayırımında agaroz jel'e oranla daha etkilidir. Ayrıca PAGE'den elde edilen DNA oldukça saf olup değişik amaçlarla kullanılabilir. Buna karşılık Agoroz jel elektroforez sonucu elde edilen DNA çoğunlukla inhibitörler tarafından kontamine edilir. Agoroz jel elektroforez dikey olarak PAGE ise yatay olarak gerçekleştirilir. Ethidium bromide'le boyama tekniğinin sekans spesifitesi zayıftır. Çünkü, istenmeyen ve ilgisi olmayan DNA'nın amplifikasyon bantlarını ortaya koyamamaktadır. Özgün olmayan DNA'lar da amplifiye olabileceğinden özgün olmayan bant analizleri ile tam olarak belirlenmemektedirler ve kontrol gruplar kullanılsa bile yine de sorunlar ortaya çıkmaktadır.

Yukarıdaki metotlara ilaveten PZR ürünlerinin analizinde, Southern blot veya Dot blot prosedürleri gibi radyoaktif olmayan spesifik problemlerin kullanıldığı ve çok daha duyarlı olan yöntemler de geliştirilmiştir. Bu metotların radyoaktif metotlara göre birçok avantajları olmasına rağmen çok zaman almaları ve uygulamalarının zorluğu nedeniyle kullanımlarını

sınırlamaktadır (Coote 1990, Çetinkaya 1998, Taylor 1993, Tompkins 1992).

Çoğaltılmış ürünleri (amplikon) saptamada, son yıllarda, radyoaktif olmayan problemlerin kullanılması yönünde bir eğilim bulunmaktadır. Örneğin; biotin ve digoxigenin ile işaretlenmiş problemleri hazırlamak daha kolay ve daha uzun sürede kullanma olanağı sağlamaktadır (Coote 1990, Çetinkaya 1998).

PZR'NİN MODİFİKASYONLARI

PZR, duyarlılık ve spesifisitenin artırılması aranan genetik materyalin RNA olduğu durumlarda ya da farklı amaçlar için modifiye edilmiştir. Bunlardan önemli olan metotların çalışma mekanizmaları aşağıda bildirilmiştir (Allard ve ark. 1990, Bej ve ark. 1990, Çetinkaya 1998, Day ve ark. 1990, Sineo ve ark. 1993, Taylor 1993, Van Belkum 1994, Uçan 1997).

Inverse (Tersine Dönmüş) PZR

Bu teknik, bilinen nükleotit dizilerinin bitişiğinde bulunan fakat bilinmeyen nükleotitlerden oluşan DNA sekanslarının çoğaltımında kullanılır. Bilinmeyen sekanslar, tersine çevrilerek içe alındığı için bu adla tanımlanmaktadır. Burada çift iplikcikli hedef DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek, iki tarafta yapışkan uçlar oluşturulur ve amplifikasyon işleminden önce DNA ligaz ile çember halinde yeniden bağlanır. Primerler, normal PZR'dekinin tersi istikametinde yani içe doğru değil dışa doğru sentezlenir.

Asimetrik PZR

Hedef DNA'nın sadece bir iplikçığının amplifikasyonuna yönelik ve farklı oranda primerler kullanılarak yapılan bir polimeraz zincir reaksiyonudur. İki aşamada gerçekleştirilir. Tek iplikcikli DNA'yı, bir PZR ürününden küçük miktarda (%1-2) alarak, ve tek primeri 15 ile 30. sikluslar arasında kullanmak şartıyla, PZR sikluslarının tekrar edilmesiyle elde etmek mümkündür. Tek iplikcikli DNA kullanılması primerlerin hibridizasyonunu kontrol altında tutmak açısından avantajlıdır.

Yatık PZR

Bu tekniğin esasını morfolojik olarak sağlam hücre ve dokuların DNA'sının amplifikasyonu oluşturur. Yöntem, parafinleşmiş veya uygun ortamlarda saklanan dokular için geliştirilmiştir. Bir lam üzerinde tespit edilmiş ve morfolojik olarak sağlam hücre veya doku örnekleri hedef DNA (veya mRNA) kaynağı olarak kullanılır. Lam üzerine, proteaz solüsyonu ilave edilerek dokulardaki proteinler giderilir ve %0,5 Nonidet P40'la da permeabilitesi artırılır. Sonra üzerine çoğaltımda gerekli olan çözeltiler (primerler 4 tür dNTP, MgCl ve diğer solüsyonlar) konur ve üzerine bir lamel kapatıldıktan sonra kenarları yapışkan bir madde ile sabitleştirilir. Bu aşamadan sonra, lam alüminyum bir kaba konarak ısı bloğuna yerleştirilir. Ortalama 60 °C'de Taq polimeraz ve mineral yağ ilave edilerek lamel hemen kaldırılır. Sonrakı işlemler, standart PZR'da olduğu gibidir.

Çoklu PZR

Bu modifikasyonda; farklı hedef DNA'ların birden fazla primer çifti kullanarak aynı amplifikasyon reaksiyonunda çoğaltılması söz konusudur ve insan genomunda bulunması olası farklı genetik materyallerin saptanması amacıyla geliştirilmiştir. Multiple patojenler için pahalıya mal olan testlere göre,

farklı hedef DNA'ların aynı çoğaltma reaksiyonunda ortak-çoğaltımı, ayrıca sekansların çoğaltılabildiğinin internal kontrolleri gibi ilave avantajlara sahiptir. Burada primerlerin ve hedef DNA'ların dizaynında bazı noktaların göz önünde bulundurulması gereklidir. Örneğin hedef DNA'ların benzer uzunlukta olmaları, çok kısa olanların çok uzun olanlara oranla daha fazla çoğaltılmalarının önlenmesi açısından önemlidir. Bu teknik daha çok çevreden alınan numunelerde (su, toprak vs.) değişik organizmaların araştırılması yönünden faydalı ve pratiktir. Birden fazla patojenin aynı anda çoğaltılması sağlandığından tercih edilen bir yöntemdir.

Nested PZR

İki aşamalı amplifikasyon reaksiyonuna sahip bu test de 4 farklı primer kullanılır. Her iki periyot da, takriben 25 çoğaltma döngüsü ile gerçekleştirilir. Nested PZR'ın kullanılması tekniğin duyarlılık ve spesifisitesini önemli ölçüde yükseltir. Reaksiyonun çok yüksek duyarlılığa sahip olması, primerlerin 2 çiftinin ilk periyot ürününün spesifisitesini kanıtlaması bu birinci periyot ürünün yeni reaksiyon karışımı içine transferi ile orijinal kalıpta bulunan olası inhibitörlerin dilue edilmesi Nested PZR'ın avantajlarını oluşturur. Özellikle gaita gibi örneklerden hedef DNA'nın iyi kalitede ve istenilen oranda elde edilmesi zor olduğundan, Nested PZR ile daha iyi sonuçlara ulaşılabilir. Keza bu yöntemin standart PZR'dan 1000 kat daha fazla duyarlı olduğu da bildirilmektedir.

Bununla birlikte nested PZR çalışma materyali kontaminasyon riskini artırır. Nested PZR tek tüp veya iki tüp şeklinde uygulanabilir. Tek tüp amplifikasyonun da kullanılan müşterek bir yöntem reaksiyon komponentlerinin, mineral yağın kalın bir tabası ile fiziksel seperasyonuna dayandırılır. Çoğaltmanın ilk periyodundan sonra fiziksel barrier santrifüjasyonla uzaklaştırılarak, ilk periyot da çoğaltılan ürünü nested primerleri kullanarak yeniden çoğaltır. Başka bir yöntem de ilk periyot ve nested PZR primerleri için farklı hibridizasyon sıcaklıkları kapsar. Tek tüp reaksiyonunun avantajı çapraz-kontaminasyon riskini oldukça azaltmasıdır. Bununla birlikte bu çift tüp metodundan teknik olarak daha kompleks olup, aynı zamanda da uygulaması daha zordur.

Reverse transkriptaz PZR (RT-PZR)

Bu yöntemde, bazı virusların (hepatitis C, enfluenza virusu, picorna virusu ve diğerleri) RNA karakterindeki genetik materyallerini amplifiye etmek ve yarı ömrü kısa (sistein, sitokin, hormon gibi) proteinlere ait mesajların tespiti amaçlanmaktadır. Genetik materyal olarak RNA taşıyan organizmalardan hazırlanan RNA, ters-transkriptaz enzimi kullanılarak complementer (c)DNA'ya dönüştürülür ve PZR reaksiyonunda kullanılır. Ancak dokulardan bozulmamış RNA elde edilmesi, dokularda mevcut olan aktif ribonükleazlardan ve RNA'nın değişime meyilli yapısından dolayı, oldukça zor ve problemlidir.

Kantitatif PZR

Standart PZR, genellikle kalitatif bir karakter taşır. Son yıllarda geliştirilen yeni PZR teknikleri ile çoğaltılan hedef DNA'nın miktarı hakkında bilgi verebilecek düzeye gelmiştir. Bu yöntem, reaksiyona başlangıçta konulan hedef DNA miktarı ile,

PZR sorunda saptanan ürünün düzeyi arasındaki linear korelasyonun bulunup bulunmadığını ortaya koymaktadır.

Booster PZR

Bu metod düşük miktarlarda mevcut olan hedef sekansların etkili bir şekilde çoğaltılmasını sağlamak için geliştirilmiştir. Booster PZR "Primer-dimer"lerin oluşumunu azaltır.

RAPD-PZR (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD-PZR AP-PZR (Arbitrarily Primed PZR) olarak da bilinir. Standart bir PZR varyasyonu olmakla birlikte, özellikle tür identifikasyon çalışmalarında tercih edilen ve 8-10 nukleotid uzunluğunda tek bir primere ihtiyaç duyulan bir PZR modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır.

PZR tekniği moleküler biyolojide bir devrim yapmış ve pek çok yeni uygulamaları beraberinde getirmiş ve sonuç olarak yeni modifikasyonların da geliştirilebileceğini akla getirmektedir. PZR tekniğinin laboratuvarlarda rutin olarak kullanılması bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi bir çok mikroskobik etkenlerden ileri gelen enfeksiyöz hastalıkların teşhisinin çabuk ve doğru olarak bulunması sonucu, zamanında uygulanan tedavi, aşı ya da imha edilmesi enfeksiyöz hastalıkların yayılmasını önleyecek ve bu durum özellikle hayvancılık sektörünün verimliliğini artıracaktır.

KAYNAKLAR

- Acuna-soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate L, Schoolnik G, Wirth D (1993) Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg 48:58-70
- Allard A, Girancs R, Duto P, Wadell G (1990) Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples, J Clin Microbiol, 28: 2659-2667.
- Arda M (1995) Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği, Bilimsel Yayınlar, No: 30, Ankara.
- Barker RH (1994) Use of PZR in field. Parasitology Today 10 (3): 117-119.
- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM (1991) Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PZR) and other methods and their applications, Critical Reviews in Biochemistry and molecular Biology, 26 (4): 301-334.
- Bej AK, Steffan RJ, Di Cesarej, Haff L, Atlas RM (1990) Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes, Appl Environ Microbiol, 56, 307-314.
- Bilgehan H (1992) Klinik Mikrobiyoloji Tanı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, Şafak Matbaacılık, Ankara.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE et al (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification, Nucl Acid Res, 16, 1141-11156.
- Coote UG (1990) Amplification of Nucleic Acids by the Polymerase Chain Reaction. pp 57-59.
- Çağlayan SH (1991) Polimeraz Zincir Reaksiyonu; Nükleik asitleri çoğalma tekniği ve uygulama alanları, Doğa Tr J of Biology, 15, 9-21.
- Çetinkaya B (1998) Polimeraz, Zincir Reaksiyonu (PZR) Temel Prensipler, FÜ Sağlık Bilimleri Dergisi (Yayınlanma Aşamasında), Elazığ.
- Day PJR, Bevan IS, Gurney SJ, Yaung LS, Walker MR (1990) Synthesis in vitro and application of biotinylated DNA probes for human papilloma virus type 16 by utilizing the polymerase chain reaction, Biochem J, 267, 119-123.
- Dedyurin MA, Pomortsev CN, Emel'yanov BM, Petrovicheva OD (1962) Complement-fixation testing for toxoplasmosis in 91 dogs. Veterinaria (Moscow), 3: 58-60.
- Direnzo S, Jungkind D, Beavis KG, Silverman NS (1996) Evaluation of automated COBAS AMPLICOR PZR System for detection of several infectious agents and its impact on laboratory management, Journal of Clinical Microbiology, 34, 2778-2783.
- Erlach HA, Arnheim N (1992) Genetic analysis using the polymerase chain reaction. Annu Rev Genet 26: 479-506
- Erlach HA, Gelfand D, Sninsky JJ (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction, Science, 252, 1643-1651.
- Göral G (1996) Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji (Bakteri Genetiği), Bölüm-5, Hünkar Ofset Matbaacılık, 55-59, 223, İstanbul.
- Guay JM, Dubois D, Morency MJ, Gagnon S, Mercier J, Levesque RC (1993) Detection of the apathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 31 (2): 203-207.
- Hangen-Mann KC (1990) Polymerase chain reaction-some guidelines for a successful amplification, BFE, 7 (4), 313-316.
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand OH, Brow MAD (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA, Proc Natl Acad Sci USA, 85, 3436-3440.
- Jackson DP, Hander JD, Quirke P (1993) Extraction of nucleic acid from fresh and archival material "In PZR: A practical Approach" Eds: Mc Pherson. MJ, Quirke P, Taylor GR; Oxford University Press, pp 29-50, Oxford.
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH (1989) Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*, J Biol Chem, 264, 6427-6437.
- Lee JC, Chang JG (1994) Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PZR) fingerprints in forensic species identification. Forensic Sci Int 67 (2):103-107
- Marx JL (1988) Multiplying Genes by leaps and Bounds, Science, 240, 1408-1410.

- Matthews RC, Burrie JP (1991) Handbook of serodiagnosis in infectious diseases, Chapter 8, 1st Ed. Published Butter wort Heineman Ltd, London.
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Sci Am*, 262 (4), 56-65.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Spesific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction, *Methods Enzymol*, 155, 335-351.
- Penner GA, Bush A, Wise R, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G (1993) Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PZR Methods Appl* 2 (4): 341-345.
- Perssing DH (1991) Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches; *J Clin Microbial*, 29, 1281-1285.
- Reubel GH, Studdert MJ (1998) Benefits and limitations of polymerase chain reaction (PZR) in veterinary diagnostic virology, *Veterinary Bulletin*, 68, 5.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Harn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239, 487-491.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Enlich HH, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of B-Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickel Cell Anemia, *Science*, 230, 1350-1354.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 6230-6234.
- Sarkar G, Sommer S (1990) Shedding light on PZR contamination, *Nature*, 343, 27.
- Steffan RJ, Atlas RM (1991) Polymerase Chain Reaction: Applications in environmental microbiology, *Annu Rev Microbial*, 45, 137-161.
- Sineo L, Martini R, Borghi G, Failli M (1993) Analysis of genetic markers by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PZR). *Boll Chim Farm* 132 (6):201-202
- Taylor GR (1993) Polymerase chain reaction: Basic principles and automation, "In PZR-A practical Approach" Eds: Mc Pherson MJ, Quirke P and Taylor GR; Oxford University Press, 1-14, Oxford.
- Tompkins LS (1992) The use of molecular methods in infectious disease. *New England J Med* 327 (18): 1290-1297.
- Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences, *Nucl Acid Res*, 16, 81-86.
- Tuncel G (1993) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *Listeria monocytogenes*'lerin Belirlenmesi, EÜ Mühendislik Fakültesi Derg, 11 (2) 37-46.
- Ucan US (1997) T cells and cytokines in the intestinal lamina propria of the pig. PhD dissertation. Bristol (UK): University of Bristol.
- Van Belkum A (1994) DNA fingerprinting of medically important microorganisms by the use of PZR. *Clin Mikrobiol Rew* 7(2):174-184.
- Verhasselt P, Voet M, Volckaert G (1992) DNA sequencing by a subcloning-walking strategy using a specific and semi-random primer in the polymerase chain reaction. *Int J Parasitol* 28 (7): 1053-1060
- Virella G (1997) Microbiology Infectious Disease, Çeviri yazarları: Serter D, Dereli D, Ertem E 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, Tayf ofset, Savaş Cilttevi, 93-275, İstanbul.